

## OKSIDASI LIPOPROTEIN DENSITAS RENDAH DAN ATEROSKLEROSIS

Sri Raharjo

Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

### Abstract

One of the earliest lesion of atherosclerosis is indicated by fatty streaks appearance. The fatty streak contains foam cell which are mostly derived from monocytes. The uptake of oxidatively modified low density lipoprotein (LDL) is not down regulated by the native LDL receptors. Oxidized LDL exhibits a chemotactic activity and a cytotoxicity. With the discovery the cells of the vascular system can induce lipid peroxidation in the LDL particle, it appears now more reasonable that reactive aldehydes including malonaldehyde are generated within the LDL particle itself. Subsequently it interact at or near the site of their origin with neighboring free amino groups and other functional groups of the apo-B polypeptide chain. Vitamin E is a true antioxidant in the LDL and is most likely located in the outer phospholipid layer with the chromanol ring facing the aqueous phase.

### PENDAHULUAN

Lipoprotein berdensitas rendah (LDL) merupakan sarana utama untuk mengangkut kolesterol dalam darah. Hingga saat ini sudah banyak diketahui bahwa LDL merupakan sumber kolesterol yang 'jahat' karena menyebabkan penimbunan kolesterol pada saluran darah. Disamping itu kenaikan kadar LDL dalam plasma diketahui memiliki korelasi positif dengan resiko terjadinya aterosklerosis. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa LDL bisa teroksidasi *in vivo* dan LDL yang teroksidasi diduga merupakan salah satu komponen yang menyebabkan terjadinya lesi awal yang mengarah terbentuknya aterosklerosis. Beberapa hasil penelitian yang penting untuk dicatat dalam hal ini adalah : (a) LDL yang teroksidasi memiliki properti kemotaksis dan apabila LDL tersebut terdapat pada lapisan intima dari arteri maka akan menarik sel-sel monosit darah yang selanjutnya akan berkembang menjadi makrofag; (b) selanjutnya makrofag akan mengambil LDL yang teroksidasi secara tidak terkendali kemudian membentuk sel busa (foam cell) yang sangat berlemak; (c) LDL teroksidasi sangat sitotoksik sehingga bisa menyebabkan kerusakan pada lapisan endotelial dan destruksi sel-sel otot polos. Tujuan dari review ini adalah mengkaji hasil penelitian tentang oksidasi LDL hubungannya dengan aterosklerosis yang telah dipublikasi hingga kini.

### ATEROSKLEROSIS

Lesi aterosklerosis dini ditandai oleh akumulasi sel-sel yang berisi kolesterol dan kolesterol ester yang kenampakannya menyerupai busa (foam) sehingga disebut sebagai sel-sel busa. Apabila aterosklerosis berlanjut maka lesi tersebut dapat berubah menjadi timbunan lemak (fatty streak) dan plak (Ross and Glomset, 1976; Gerrity, 1981; Aql et al., 1984; Rosenfeld et. al., 1987). Prekursor dari sel busa pada umumnya adalah monosit-makrofag yang masuk kedalam lapisan intima, namun ada juga yang berasal dari sel-sel otot polos (Wissler, 1978). Makrofag yang ditumbuhkan dalam kultur ternyata hanya mampu mengambil LDL natif secara lambat, bahkan jika makrofag diinkubasikan lebih lama dalam media mengandung LDL tinggi ternyata makrofag tersebut tidak mengakumulasi kolesterol ester dan tidak berubah menjadi sel-sel yang berlemak (Brown et al., 1980).

Pengambilan LDL natif oleh monosit-makrofag berlangsung melalui reseptor LDL (reseptor apo B/E) yang sekaligus berfungsi sebagai pengendali, yaitu apabila kadar kolesterol intraseluler meningkat maka semakin banyak LDL yang diambil oleh makrofag. Brown and Goldstein (1983) menemukan bahwa makrofag juga mengekspresikan reseptor penangkap (scavenger receptor) yang memungkinkan terjadinya endositosis terhadap LDL yang telah termodifikasi. Reseptor ini tidak dikendalikan oleh status kolesterol intraseluler. Dalam kultur sel, pengambilan LDL termodifikasi melalui reseptor penangkap dapat mengakibatkan akumulasi kolesterol yang selanjutnya tersimpan dalam bentuk titik-titik lemak, sehingga makrofag berubah menjadi sel-sel menyerupai sel busa. Dalam penelitian itu Brown dan Goldstein (1983) menggunakan LDL yang telah direaksikan secara *in vitro* dengan asam asetat anhidrid. Salah satu hasil dari reaksi tersebut adalah terjadinya asetilasi pada e-amino grup dari residu lisin pada protein apo B, sebagai akibatnya maka muatan positifnya menjadi hilang dan sebaliknya muatan negatif pada permukaan LDL menjadi bertambah.

Reseptor untuk LDL mampu mengenali domain bermuatan positif yang berasal dari residu lisin, arginin dan histidin pada protein apo B (Gianturco and Bradley, 1987). Apabila domain tersebut mengalami perubahan, misal dengan adanya asetilasi terhadap gugus amino bebas, maka reseptor tidak mampu mengenali LDL yang sudah terasetilasi. Sebaliknya peningkatan LDL termodifikasi oleh

reseptor penangkap (scavenger receptor) menjadi lebih mudah karena adanya muatan negatif pada protein apo B yang telah termodifikasi. Hal ini didukung hasil penelitian dari Brown et al. (1980) yang menunjukkan bahwa peningkatan muatan negatif pada apo B melalui modifikasi kimiawi ternyata meningkatkan kemampuan dari reseptor penangkap untuk mengambil kolesterol pada LDL yang sudah termodifikasi. Modifikasi LDL tersebut bisa dilakukan secara kimiawi melalui asetilasi, asetoasetilasi, karbamilasi, suksinilasi serta perlakuan dengan glutaraldehid (Haberland et al., 1984). Seluruh prosedur di atas memiliki kesamaan pada kemampuannya untuk bereaksi dengan gugus amino bebas (misal  $\epsilon$ -amino group) dari residu lisin. Meskipun demikian hal tersebut tidak terjadi secara *in vivo*, sehingga hingga kini masih belum jelas senyawa apa yang bisa memodifikasi LDL secara *in vivo*. Fogelman et al. (1980) menduga bahwa malonaldehid yang dihasilkan oleh sel-sel inflamatori yang ada pada arteri yang terluka merupakan senyawa yang mampu memodifikasi LDL natif *in vivo* menjadi termodifikasi yang dikenal oleh scavenger receptor. Penelitian tentang inkubasi LDL dengan malonaldehid menghasilkan makrofag yang berisi kolesterol (Haberland et al., 1982; Haberland and Fogelman, 1987). Namun malonaldehid yang digunakan dalam inkubasi tersebut konsentrasinya sangat tinggi (10 - 100 mM) dan sel-sel inflamatori tidak akan mungkin bisa menghasilkan malonaldehid setinggi itu. Penelitian lain menunjukkan bahwa sel-sel pada sistem vaskuler bisa menginduksi peroksidasi lemak pada partikel LDL (Steinbrecher et al., 1984). Oleh karena itu sangat besar kemungkinannya bahwa bukan hanya malonaldehid tetapi juga senyawa aldehid lain bisa dihasilkan di dalam partikel LDL sendiri, yang selanjutnya berinteraksi dengan gugus fungsional dari protein apo-B.

#### MODIFIKASI LDL OLEH OKSIDASI LEMAK

Akibat lain yang ditimbulkan oleh oksidasi lemak pada LDL yaitu degradasi protein apo-B menjadi fragmen peptida yang berukuran lebih kecil (Schuh et al., 1987; Steinbrecher et al., 1984). Sangat besar kemungkinannya bahwa degradasi apo-B ataupun reaksi aldehid dengan apo-B secara bersama-sama menyebabkan perubahan struktur/bentuk apo-B yang tidak terkendali lagi oleh reseptor B/E, melainkan justru bisa berikatan dengan scavenger receptor. Partikel LDL yang sudah teroksidasi bersifat toksik terhadap sel-sel endotelial, sel-sel otot polos, dan fibroblas. Di samping itu biasanya sel-sel yang sedang proliferasi lebih rentan terhadap LDL teroksidasi daripada sel-sel yang sedang dalam fase tidak berproliferasi (Hessler et al., 1983; Morel et al., 1983). Komponen dari LDL teroksidasi yang bersifat toksik ternyata tidak berupa protein, namun komponen toksik tersebut berada dalam fase lipida pada partikel LDL. Karakteristik dari komponen toksik pada LDL teroksidasi dapat ditiru dengan modifikasi LDL secara kimiawi dengan menggunakan 4-

hidroksinonenal (HNE). Partikel LDL yang telah diperlakukan dengan HNE menunjukkan penghambatan pertumbuhan sel fibroblas yang sebanding dengan partikel LDL teroksidasi (Hoff et al., 1988).

Kaneko et al., (1987) meneliti sitotoksitas dan penghambatan pertumbuhan dari produk peroksidasi lemak pada kultur sel fibroblas dan sel endotelial. Hasilnya menunjukkan bahwa senyawa hasil dari peroksidasi lemak yang paling toksik adalah 2, 4-alkadienal (yaitu nonadienal dan dekadienal) serta 4-HNE, sedangkan alkenal dan alkana toksisitasnya lebih rendah. Perlakuan aldehid menunjukkan bahwa toksisitasnya meningkat sebanding dengan bertambah panjangnya rantai karbonnya (Kaneko et al., 1988). Lisofosfatida yang diketahui juga terdapat dalam partikel LDL teroksidasi ternyata bisa menimbulkan gangguan bagi sel, misalnya penghambatan terhadap pompa K/Na (Parthasarathy et al., 1985).

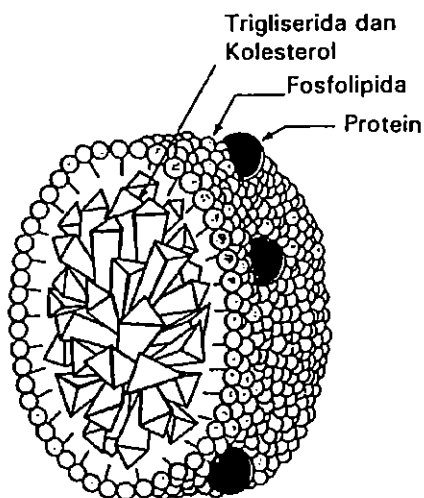
Hingga kini belum diketahui dengan jelas tentang toksisitas dari LDL teroksidasi apakah hanya disebabkan oleh satu senyawa ataukah dari kombinasi berbagai senyawa hasil proses peroksidasi lemak pada LDL. Adanya hipotesis bahwa LDL teroksidasi adalah atherogenik maka sitotoksitas dari LDL tersebut menjadi satu aspek yang sangat penting. Oleh karena itu identifikasi senyawa yang bersifat sitotoksik dan penjelasan tentang mekanisme kematian sel yang disebabkan oleh senyawa yang dihasilkan oleh LDL teroksidasi perlu perhatian lebih lanjut. Hal yang sama juga berlaku untuk karakteristik kemotaktis dari LDL teroksidasi. Parthasarathy et al. (1985) menduga bahwa oksidasi LDL menyebabkan aktivasi fosfolipase A<sub>2</sub> yang selanjutnya menyebabkan terlepasnya lisofosfatida dan asam lemak teroksidasi. Dalam kondisi *In vitro* diketahui bahwa lisofosfatida menunjukkan peran sebagai penarik monosit darah (Quinn et al., 1987).

Hipotesis yang menyatakan bahwa LDL teroksidasi memiliki peran yang krusial dalam patogenesis dari arteriosklerosis selanjutnya bisa muncul dengan didukung beberapa bukti meskipun secara tidak langsung. Misalnya, Glavind et al. (1952) mengemukakan bahwa lesi atherosklerosis pada aorta manusia (diperoleh dalam kondisi post mortem) mengandung peroksida lemak dan tingkat peroksidasi lemak tersebut berkaitan dengan perkembangan atheromata. Pasien penderita penyakit jantung diketahui memiliki kenaikan kadar peroksida lemak dalam serumnya. Hal yang sama juga ditemukan pada perokok kronis dan diabetes (Goto, 1982). Kadar peroksida lemak dalam plasma nampaknya semakin meningkat dengan bertambahnya usia (Yagi, 1986). Pemberian probucol yang memiliki efek anti-atherogenik antara lain didasarkan pada kemampuannya untuk masuk ke dalam LDL dan melindunginya dari oksidasi (Carew et al., 1987; Kita et al., 1987). Probucool memiliki struktur sangat mirip dengan antioksidan sintetik BHT (butylated hydroxytoluene). Hasil penelitian epidemiologis pada populasi masyarakat di Eropa menunjukkan adanya hubungan yang negatif antara kadar antioksidan dalam plasma darah dengan tingkat resiko penyakit

kardiovaaskuler. Semakin tinggi kadar vitamin E dalam plasma berkaitan dengan semakin rendahnya tingkat mortalitas akibat penyakit jantung (Gey and Puska, 1989).

#### KOMPOSISI LDL

Partikel LDL dalam manusia berbentuk bola seperti terlihat pada Gambar 1 (Kritchevsky, 1979) dengan diameter sekitar 22 nm dan rata-rata berat molekul sekitar 2.500.000 (Goldstein and Brown, 1978) serta densitas sekitar 1,020 - 1,050 g/mL (Esterbauer et al., 1990). Setiap partikel LDL tersusun dari 20 - 24 % fosfolipida, 9 - 10 % kolesterol (bebas), 40 - 44 % kolesterol ester, 3 - 5 % trigliserida, dan 21 - 26 % protein. Kolesterol ester dan trigliserida sebagai lemak netral membentuk bagian pusat yang hidrofobik yang dilapisi oleh lapisan tunggal yang tersusun dari kolesterol dan fosfolipida. Pada lapisan inilah terdapat sebuah protein yang disebut apolipoprotein B dengan berat molekul sekitar 500.000 (Goldstein and Brown, 1978). Berdasarkan berat molekul yang sudah diketahui maka Esterbauer et al. (1990) menganalisa lebih lanjut bahwa lapisan tunggal tersebut terdiri dari sekitar 700 molekul fosfolipida dan 600 molekul kolesterol, sedangkan bagian pusatnya tersusun dari sekitar 1600 molekul kolesterol ester dan 100 molekul trigliserida (Tabel 1). Komposisi asam lemak dari partikel LDL yang diekstraksi dan ditera dengan kromatografi gas berkolom kapiler juga ditunjukkan pada Tabel 1 (Esterbauer et al., 1987; 1988a; 1989a). Jumlah seluruh asam lemak yang tersebar pada berbagai kelompok lemak rata-rata sekitar 2700 molekul, separuh diantaranya adalah asam lemak tak jenuh jamak terutama asam linoleat ( $C_{18:2}$ ) dan arakidonat ( $C_{24:4}$ ). Analisa lebih lanjut terhadap distribusi asam lemak pada beberapa kelompok lemak dalam partikel LDL menunjukkan distribusi yang tidak sama (Esterbauer et al., 1990). Asam linoleat pada umumnya banyak (68 %) terikat pada fosfolipida. Asam dokosaheksanoat hanya bisa ditemukan pada fosfolipida.



Gambar 1. Struktur skemis partikel lipoprotein berdensitas rendah  
(Sumber : Kritchevsky, 1979)

Tabel 1. Komposisi LDL dari darah manusia

	n	mg/mg LDL	Perkiraan Jumlah molekul dalam tiap LDL partikel
Fosfolipida	6	271 ± 19	700
Kolesterol	6	94 ± 6	600
Kolesterol ester	6	414 ± 14	1600
Trigliserida	6	37 ± 10	100
Protein	6	237 ± 20	1
Asam Miristat	4	6,6 ± 2,0	70
Asam Palmitat	19	70,9 ± 20,9	700
Asam palmitoleat	19	4,3 ± 2,5	50
Asam Stearat	19	16,3 ± 7,4	150
Asam Oleat	19	57,2 ± 18,3	450
Asam linoleat	19	120,8 ± 32,4	1100
Asam arakidonat	19	16,1 ± 8,8	150
Asam dokosaheksanoat	4	2,1 ± 2,0	20
Total asam lemak	19	290	2700
Total PUFA*	19	138	1300
α-tokoferol	25	1,03 ± 0,27	6
γ-tokoferol	25	0,087 ± 0,033	0,5
β-karoten	20	0,069 ± 0,048	0,3
likopen	20	0,037 ± 0,017	0,2

Sumber : Esterbauer et al., 1990.

\* : Polyunsaturated fatty acids,

n : Jumlah sampel LDL dari individu yang berbeda

Jumlah molekul asam lemak di dalam partikel LDL secara tidak langsung bisa dihitung berdasarkan jumlah molekul fosfolipida, kolesterol ester dan trigliserida. Dengan cara ini maka akan diperoleh jumlah molekul asam lemak sekitar 3300. Hal ini berbeda dengan hasil analisa yang dilaporkan oleh Esterbauer et al. (1990) yang menunjukkan angka 2700 molekul asam lemak. Perbedaan ini bisa disebabkan antara lain oleh variasi komposisi LDL sampel dari donor. Di samping itu bisa juga disebabkan oleh perbedaan dasar perhitungan yang digunakan untuk menghitung jumlah total LDL. Analisa asam lemak didasarkan pada total berat kering atau total kandungan kolesterol. Esterbauer et al. (1990) menggunakan faktor konversi dalam menghitung jumlah partikel LDL ( $LDL \text{ mg/mL} = 3,16 \times \text{total kolesterol mg/mL}$ ), sedangkan total kolesterol ditentukan menggunakan metoda Monotest dari Boehringer Mannheim.

Bila dihitung dalam basis molar maka antioksidan terbanyak dalam LDL adalah α-tokoferol, yaitu rata-rata sekitar 1,03 µg/mg LDL (Esterbauer et al., 1989b). Kadar tersebut kurang lebih setara dengan 6 molekul α-tokoferol dalam setiap partikel LDL. Senyawa antioksidan lain yang telah terdeteksi (misal : gama-tokoferol, β-karoten dan likopen) dalam partikel LDL jumlahnya amat sedikit.

Hingga kini sudah terdeteksi kurang lebih sebanyak 20 macam karotenoid dalam plasma darah, oleh karena itu sangat mungkin bukan hanya  $\beta$ -karoten dan likopen yang terdapat dalam LDL namun masih banyak antioksidan lain seperti  $\alpha$ -karoten, zeasantin, kriptosantin, fitofluena (Esterbauer et al., 1988b; 1989a; 1989b; 1990; Di Mascio et al., 1989). Pada Tabel 1 dituliskan jumlah molekul antioksidan lain yang terdapat dalam 1 partikel LDL. Untuk  $\beta$ -karoten tertulis angka 0,3 berarti bahwa hanya sebagian dari partikel LDL yang mengandung  $\beta$ -karoten sedangkan partikel LDL yang lain tidak mengandung. Belum diketahui apakah keberadaan antioksidan dalam LDL dapat berpindah dari satu partikel ke partikel LDL yang lain. Berdasarkan angka hasil perhitungan yang tertera pada Tabel 1 maka diperkirakan perbandingan jumlah molekul antioksidan dengan PUFA adalah 1 : 200. Khusus untuk jumlah vitamin E keberadaannya berbanding lurus dengan jumlah molekul PUFA.

Urutan asam amino penyusun komponen protein apo-B telah diketahui dan tiap satu komponen protein apo-B (512,937 Da) mengandung 478 Asp + Asn, 298 Thr, 393 Ser, 529 Glu+Gln, 169 Pro, 207 Gly, 266 Ala, 25 Cys, 251 Val, 78 Met, 288 Ile, 523 Leu, 152 Tyr, 223 Phe, 115 His, 356 Lys, 148 Arg dan 37 Trp (Yang et al., 1987). Sedangkan karbohidrat penyusun komponen apo-B mencapai sekitar 8-10% (berdasarkan berat kering masa LDL) dan terdiri dari manosa, galaktosa, glukosamin, dan asam sialat (Esterbauer et al., 1990).

#### MODIFIKASI LDL OLEH SEL-SEL VASKULER

Partikel LDL dengan konsentrasi 1 mg/mL yang diinkubasikan selama 24 jam bersama dengan sel endotelial dari aorta kelinci menyebabkan LDL diambil oleh makrofag peritoneal dari mencit 3-4 kali lebih cepat dibandingkan LDL kontrol yang diinkubasikan tanpa sel endotelial tersebut (Henriksen et al., 1981). Diduga sel endotelial bisa memodifikasi LDL menjadi terasetilasi. Mekanisme sel endotelial memodifikasi partikel LDL semakin jelas ketika dua grup peneliti secara terpisah menemukan bahwa medium yang telah digunakan untuk menginkubasikan LDL mengandung thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). Oleh karena itu disimpulkan bahwa sel-sel endotelial yang diinkubasikan bersama dengan LDL mampu menginisiasi proses peroksidasi lemak dalam partikel LDL. Sebagai akibat proses oksidasi lemak ini maka komponen protein apo-B menjadi berubah sedemikian hingga menjadi bisa dikenali oleh scavenger receptor (Steinbrecher et al., 1984; Morel et al., 1984). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Fogelman et al. (1980) yang melaporkan bahwa partikel LDL yang diinkubasi dengan malonaldehidida akhir terambil melalui scavenger receptor. Selanjutnya diasumsikan bahwa malonaldehidida yang dihasilkan dari proses peroksidasi bereaksi dengan asam amino (residu lisin) dari protein apo-B. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa sel endotel, sel otot polos dan makrofag mampu mengoksidasi partikel LDL selama

inkubasi dan mengubahnya menjadi suatu bentuk yang dikenali oleh scavenger receptor dari makrofag.

Mengenai waktu terbentuknya TBARS selama inkubasi LDL dengan sel menunjukkan data yang berlainan. Antara sel-sel otot polos pada aorta manusia, sel endotel pada aorta kelinci paling banyak menghasilkan TBARS dalam waktu yang terpendek (Hiramatsu et al., 1987). Dalam percobaan oksidasi LDL dalam PBS (phosphate buffered saline) yang disuplementasi dengan  $\text{Cu}^{2+}$ , proses pembentukan TBARS diawali fase lag dimana belum terbentuk TBARS sama sekali. Bila LDL diinkubasi dengan sel maka fase lag tersebut hanya berlangsung selama sekitar 3 jam, sedangkan bila diinkubasikan tanpa sel maka fase lag bisa berlangsung hingga 6 jam. Setelah fase lag dilampaui maka pada fase selanjutnya (hingga 12 jam) laju pembentukan TBARS pada kedua kondisi inkubasi tersebut tidak berbeda nyata (Esterbauer et al., 1990). Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan kondisi inkubasi (dengan atau tanpa sel) hanya bisa dilihat pada kisaran waktu inkubasi yang relatif pendek yaitu 3 - 6 jam.

Perlu disampaikan juga bahwa kadar TBARS yang dilaporkan dari berbagai penelitian menunjukkan variasi yang besar meskipun diinkubasikan dengan sel dan medium yang sama. Pada penelitian menggunakan sel endotel dan medium M199 dihasilkan kisaran TBARS 1.85 - 6.2 nmol MDA/mg LDL (Morel et al., 1984; van Hinsbergh et al., 1986); bila digunakan sel endotel dan medium F10 maka diperoleh kisaran TBARS 2.0 - 14.6 nmol MDA/mg LDL (Steinbrecher et al., 1984; Parthasarathy et al., 1985). Ada beberapa alasan yang bisa digunakan untuk menjelaskan terjadinya variasi TBARS yang cukup besar tersebut yaitu antara lain adanya perbedaan dalam cara pengukuran TBARS, interferensi absorbansi dari phenol red yang digunakan dalam medium inkubasi, dihasilkannya MDA oleh sel-sel yang mati atau rusak, dan perbedaan kandungan asam lemak pada partikel LDL. Sebelumnya pernah dinyatakan bahwa MDA hanya bisa terbentuk dari asam lemak tidak jenuh dengan sedikitnya 3 ikatan rangkap atau lebih, yaitu misalnya asam arakidonat (Esterbauer et al., 1989c). Kadar asam arakidonat pada partikel LDL juga sangat bervariasi antara donor satu dengan lainnya.

#### PERAN ANTIOKSIDAN DALAM MENCEGAH OKSIDASI LDL

Penambahan vitamin E dengan konsentrasi yang tinggi (100  $\mu\text{M}$ ) pada medium inkubasi ternyata mampu mencegah oksidasi partikel LDL yang dimediasi oleh sel-sel dalam medium inkubasi. Konsentrasi vitamin E sebesar 100  $\mu\text{M}$  adalah setara dengan 200 nmol vitamin E per mg LDL, atau setara dengan 100 kali lebih tinggi dari pada kadar vitamin E yang terkandung dalam LDL secara alami. Esterbauer et al. (1989b) mencoba menentukan kapasitas antioksidatif dari antioksidan endogenus dalam partikel LDL. Untuk itu satu batch LDL (0.25 mg/mL) dibagi menjadi dua bagian sebelum reaksi oksidasi yang dimulai dengan penambahan  $\text{Cu}^{2+}$  (1,66  $\mu\text{M}$ ). Bagian pertama

digunakan untuk mengukur kinetika peroksida lemak melalui kenaikan absorbansi pada 234 nm, sedang bagian yang lain untuk analisa kandungan antioksidan. Hasilnya menunjukkan bahwa perlindungan terhadap oksidasi lemak pertama kali dilakukan oleh vitamin E, terutama  $\alpha$ -tokoferol dan gamma-tokoferol. Apabila vitamin E sudah habis terpakai maka perlindungan terhadap oksidasi lemak selanjutnya dilakukan oleh karotenoid terutama likopen,  $\beta$ -karoten dan fitofluen. Ketika perlindungan lapis kedua ini sudah tidak mampu lagi menahan, maka prokasi reaksi oksidasi berantai mulai berlangsung yang ditunjukkan dengan meningkatnya absorbansi pada 234 nm. Urutan perlindungan terhadap oksidasi lemak ini masih sama meskipun di dalam medium inkubasi (PBS) ditambahkan antioksidan yang larut dalam air. Penambahan asam urat dan askorbat dalam medium inkubasi bisa memperpanjang periode fase lag proportional dengan konsentrasinya. Lebih khusus lagi adanya antioksidan yang larut dalam air ternyata dapat menghambat kerusakan antioksidatif endogenus dalam LDL. Apabila dalam medium inkubasi ditambahkan 10  $\mu$ M asam askorbat maka konsentrasi antioksidan endogenus tetap tidak berubah selama 90 menit pertama, selama waktu itu konsentrasi asam askorbat menurun jadi nol. Selanjutnya konsentrasi vitamin E dan karotenoid mulai menurun dengan urutan yang sama dengan kondisi jika asam askorbat tidak ditambahkan pada medium inkubasi. Akhirnya peroksidasi lemak memasuki tahap propagasi reaksi berantai ketika LDL sudah kehabisan antioksidan endogenus yang lipofilik (Esterbauer et al., 1989b).

Vitamin E dalam LDL terletak pada lapisan fosfolipida bagian luar dengan cincin kromanol menghadap ke luar ke arah fase air. Peran vitamin C sebagai antioksidan yang larut dalam air ditunjukkan dengan kemampuannya untuk mereaktifasi vitamin E yang sudah dilemahkan oleh peroksi radikal. Mengingat urutannya bahwa vitamin E lebih dahulu teroksidasi sebelum karotenoid maka vitamin E diduga memiliki peran melindungi karotenoid dari serangan radikal bebas (Esterbauer et al., 1989a). Namun demikian mekanisme reaktifasi karotenoid yang sudah bereaksi dengan radikal oleh vitamin E hingga kini masih belum jelas.

Untuk membuktikan lebih jauh bahwa vitamin E adalah antioksidan dalam LDL maka dilakukan penelitian menggunakan plasma darah yang disuplementasi dengan D.L- $\alpha$ -tokoferol (125 - 1000  $\mu$ M) sebelum dilakukan isolasi LDL (Esterbauer et al., 1990). Dengan cara ini kadar  $\alpha$ -tokoferol dalam LDL, sehingga lama fase lag menjadi lebih panjang sebanding dengan kenaikan kadar  $\alpha$ -tokoferol dalam LDL.

## ALDEHIDA DALAM LDL YANG TEROKSIDASI

Sudah banyak diketahui dan dibuktikan oleh berbagai penelitian bahwa beberapa jenis aldehida terbentuk melalui proses dekomposisi hidroperoksida asam lemak. Partikel LDL bisa membentuk senyawa-senyawa aldehida apabila partikel LDL tersebut diinkubasikan selama 24 jam dengan bufer yang telah disaturasi oksigennya. Jumlah total kadar aldehida rata-rata dalam partikel LDL reratanya adalah 5.76 nmol/mg LDL. Adapun distribusi dari masing-masing aldehida adalah MDA (36.6 %), heksanal (25%), propanal (8.9%), 4-hidroksinonenal (8.2%), butanal (7.6%), 2,4-heptadienal (4.1%), pentanal (3.4%), 4-hidroksiheksenal (3.4%), dan 4-hidroksioktenal (3.5%). LDL yang diinkubasikan dalam PBS yang mengandung 1.66  $\mu$ M  $\text{Cu}^{2+}$  selama 2 jam diketahui di dalamnya terakumulasi senyawa aldehid (Esterbauer et al., 1989c). Dalam hal ini jumlah keseluruhan aldehid yang terakumulasi mencapai 40 nmol/mg LDL, sekitar 41% diantaranya adalah malonaldehid (MDA) dan 8,8% adalah 4-hidroksinonenal (HNE). Esterbauer et al. (1987) menyatakan bahwa 90% dari TBARS adalah terdiri dari malonaldehid bebas. Malonaldehid merupakan substansi yang hidrofilik dan hampir seluruhnya dilepaskan dari bagian LDL yang lipofilik menuju bagian di sekitar LDL yang berfase air, sedangkan senyawa aldehid yang lain karena sifatnya lipofilik maka sebagian besar tetap berada di dalam LDL dan bisa mencapai konsentrasi milimolar. Konsentrasi setinggi itu dinilai cukup untuk menimbulkan reaksi dengan asam amino pada protein apo B, misalnya terjadi ikatan dengan gugus amino bebas.

Reaksi antara aldehid dengan gugus amino sangat mungkin terjadi dengan pembentukan basa Schiff melalui reaksi gugus aldehid dan gugus  $\text{NH}_2$ . Aldehid dengan konfigurasi  $\alpha$ ,  $\beta$  dan mengandung ikatan rangkap (misal :  $\text{CH} = \text{CH} - \text{CHO}$ ) adalah bersifat fungsional ganda (bifunctional) dan dapat bereaksi dengan nukleofil (misal  $\text{NH}_2$ ,  $\text{SH}$ ,  $\text{OH}$ ) membentuk 'Michael adducts' dengan nukleofil  $\text{XH}$  terikat pada karbon nomor 3 yaitu seperti  $\text{CHX} - \text{CH}_2 - \text{CHO}$ . Gugus CHO selanjutnya mampu berkonsentrasi dengan  $\text{NH}_2$  membentuk basa Schiff (Esterbauer et al., 1976; Esterbauer, 1985).

Reaksi malonaldehid dengan gugus amino akan membentuk struktur aminoiminopropena ( $\text{RN} = \text{CH} - \text{CH} = \text{NHR}$ ). Berbagai reaksi mungkin sekali berlangsung setelah diawali dengan terikatnya aldehid pada komponen apo-B. Adanya aldehid atau gugus fungsional karbonil dalam komponen apo-B ditunjukkan dengan mereaksikan LDL yang teroksidasi dengan 2,4-dihidroksifenilhidrazin dan diikuti pemisahan apo-B dari bagian lemaknya. Apo-B yang terpisahkan berwarna kuning sebagai akibat terikatnya hidrazon secara kovalen dan memberikan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 365 nm (Esterbauer et al., 1990).



## DAFTAR PUSTAKA

- Agel, N.M., Ball, R.Y., Waldman, H., and Mitchinson, M.J. 1984. Monocyte origin of foam cells in human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 53 : 256 - 271.
- Brown, M.S., Basu, S.P., Falck, J.R., Ho, Y.R., and Goldstein, J.L. 1980. The scavenger pathway for lipoprotein degradation : specificity of the binding site that mediate the uptake of negatively charged LDL by macrophage. *J. Supramol. Struct.* 13 : 67 - 81.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 1983. Lipoprotein metabolism in the macrophage : Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 52 : 223 - 261.
- Carew, T.E., Schwenke, D.C., and Steinberg, D. 1987. Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect : Evidence that antioxidants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 : 7725 - 7729.
- Curzio, M. 1988. Interaction between neutrophils and 4-hydroxyalkenals and consequences on neutrophil motility. *Free Radical Res. Commun.* 5 : 55 - 66.
- Di Mascio, P., Kaiser, S., and Sies, H. 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* 274 : 532 - 538.
- Esterbauer, H., Ertl, A., and Scholz, N. 1976. The reaction of cysteine with  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated aldehydes. *Tetrahedron* 32 : 285 - 289.
- Esterbauer, H. 1985. Lipid peroxidation products : formation, chemical properties and biological activities. Dalam *Free Radicals in Liver Injury* (Poly, G., Cheeseman, K.H., Dianzani, M.U., and Slater, T.F., Eds.), IRL Press, Oxford, England. pp. 29 - 47.
- Esterbauer, H., Jurgens, G., Quehenberger, O., and Koller, E. 1987. Autoxidation of human low density lipoprotein : Loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J. Lipid Res.* 28 : 495 - 509.
- Esterbauer, H., Quehenberger, O., and Jurgens, G. 1988a. Oxidation of human low density lipoprotein with special attention to aldehydic lipid peroxidation products. Dalam *Free radicals : Methodology and concepts* (Rice-Evans, C., and Halliwell, B., Eds.), The Richelieu Press, London, pp. 243 - 268.
- Esterbauer, H., Jurgens, G., and Quehenberger, O. 1988b. Modification of human low density lipoprotein by lipid peroxidation. Dalam *Oxygen radical in biology and medicine* (Simic, M., Taylor, K., Ward, J., and van Sonntag, C., Eds.), Plenum Press, New York. pp. 369 - 373.
- Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H., Oberreither, S., Rotheneder, M., El-Saadani, M., and Jurgens, G. 1989a. The role of vitamin E and carotenoids in preventing oxidation of low density lipoproteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 570 : 254 - 267.
- Esterbauer, H., Rotheneder, M., Striegl, G., Waeg, G., Ashy, A., Sattler, W., and Jurgens, G. 1989b. Vitamin E and other lipophilic antioxidants protect LDL against oxidation. *FAT Sci. Technol.* 91 : 316 - 324.
- Esterbauer, H., Zollner, H., and Schaur, R.J. 1989c. Aldehydes formed by lipid peroxidation : Mechanism of formation, occurrence and determination. Dalam *Membrane lipid oxidation* (Vigo-Pelfrey, C., Ed.) Vol. I., CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 239 - 268.
- Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Waeg, G., Striegl, G., and Jurgens, G. 1990. Biochemical, structural, and functional of oxidized low density lipoprotein. *Chem. Res. Toxicol.* 3 (2) : 77 - 92.
- Fogelman, A.M., Schechter, I., Saeger, J., Hokom, M., Child, J.S., and Edwards, P.A. 1980. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77 : 2214 - 2218.
- Gerrity, R.G. 1981. The role of the monocyte in atherogenesis. I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am. J. Pathol.* 103 : 181 - 190.
- Gey, K.F., and Puska, P. 1989. Plasma vitamin E and A inversely related to mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 570 : 268 - 282.
- Gianturco, S.H., and Bradley, W.A. 1987. Lipoprotein receptors. Dalam *Plasma lipoproteins* (Gotto, A.M., Ed.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 183 - 220.
- Glasgow, W.C., Harris, T.M., and Brash, A.R. 1986. A short chain aldehyde is a major lipoxygenase product in arachidonic acid stimulated porcine leucocytes. *J. Biol. Chem.* 261 : 200 - 204.
- Glavind, J., Hartmann, S., Clemmensen, J., Jessen, K.E., and Dam, H. 1952. Studies on the role of lipoperoxides in human pathology. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 30 : 1 - 6.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 1979. Low density lipoprotein pathways and its relation to atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 46 : 897 - 930.
- Goto, Y. 1982. Lipid peroxides as a cause of vascular disease. Dalam *Lipid peroxides in biology and medicine* (Yagi, K., Ed.), Academic Press, Orlando. pp. 295 - 303.
- Haberland, M.E., Fogelman, A.M., and Edwards, P.A. 1982. Specificity of receptor-mediated recognition of malondialdehyde-modified low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79 : 1712 - 1716.
- Haberland, M.E., Olch, C.L., and Fogelman, A.M. 1984. Role of lysine in mediating interaction of modified low density lipoproteins with the scavenger receptor of human monocyte macrophages. *J. Biol. Chem.* 259 : 11305 - 11311.

- Haberland, M.E., and Fogelman, A.M. 1987. The role of altered lipoprotein in the pathogenesis of low atherosclerosis. *Am. Heart J.* 113 : 573 - 577.
- Henriksen, T., Mahoney, E.M., and Steinberg, D. 1981. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells : recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78 : 6499-6503.
- Hessler, J.R., Morel, D.W., Lewis, L.J., and Chisolm, G.M. 1983. Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. *Arteriosclerosis* 3 : 215 - 222.
- Hiramatsu, K., Rosen, H., Heinecke, J.W., Wolfbaur, G., and Chait, A. 1987. Superoxide initiates oxidation of low density lipoprotein by human monocytes. *Arteriosclerosis* 7 : 55 - 60.
- Hoff, H.F., Chisolm, G.M., Morel, D.W., Jurgens, G., and Esterbauer, H. 1988. Chemical and functional changes in LDL following modification by 4-hydroxynonenal. Dalam *Oxy-radicals in Molecular Biology and Pathology* (Cerutti, P.A. McCord, J.M. and Fridovich, T., Eds.). Alan R. Liss, New York, pp. 459-472.
- Kaneko, T., Honda, S., Nakano, S.I., and Matsuo, M. 1987. Lethal effects of a linoleic acid hydroperoxide and its autoxidation products, unsaturated aliphatic aldehydes, on human diploid fibroblasts. *Chem.-Biol. Interact.* 63 : 127 - 137.
- Kaneko, T., Kaji, K., and Matsuo, M. 1988. Cytotoxicities of a linoleic acid hydroperoxide and its related aliphatic aldehydes toward cultured human umbilical vein endothelial cells. *Chem.-Biol. Interact.* 67 : 295 - 304.
- Kita, T., Nagano, Y., Yokode, M., Ishi, K., Kume, N., Ooshima, A., Yoshida, H., and Kawai, C. 1987. Probucol prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 : 5928 - 5931.
- Kritchevsky, D. 1979. An update on lipids, lipoproteins and fat metabolism. Dalam *Medicine called nutrition*. Medical education programs, Ltd. Englewoods Cliffs. p.61.
- Morel, D.W., Hessler, J.R., and Chisolm, G.M. 1983. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J. Lipid Res.* 24 : 1070-1076.
- Morel, D.W., DiCorleto, P.E., and Chisolm, G.M. 1984. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 4 : 357 - 367.
- Rosenfeld, M.E., Tsukada, T., Gown, A.M., and Ross, R. 1987. Fatty streak initiation in Watanabe heritable hyperlipidemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 1 : 9 - 23.
- Parthasarathy, S., Steinbrecher, U.P., Barnett, J., Witztum, J.L., and Steinberg, D. 1985. Essential role of phospholipase A<sub>2</sub> activity in endothelial-induced modification of low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 : 3000 - 3004.
- Quinn, M.T., Parthasarathy, S., Fong, L.G., and Steinberg, D. 1987. Oxidatively modified low density lipoproteins : A potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophage during atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 : 2995 - 2998.
- Ross, R., and Glomset, J.A. 1976. The pathogenesis of atherosclerosis (Part I). *N. Engl. J. Med.* 295 : 369 - 377.
- Schuh, J., Fairclough, G.F., and Haschemeyer, R.H. 1978. Oxygen mediated heterogeneity of apo-low-density-lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75 : 3173 - 3177.
- Steinbrecher, U.P., Parthasarathy, S., Leake, D.S., Witztum, J.L., and Steinberg, D. 1984. Modification of low density lipoprotein by endothelial cell involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81 : 3883 - 3887.
- van Hinsbergh, V.M.W., Scheffer, M., Havekes, L., and Kempen, H.J.M. 1986. Role of endothelial cells and their products in the modification of low density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 878 : 49 - 64.
- Wissler, R.W. 1978. Progression and regression of atherosclerosis lesions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 104 : 77 - 109.
- Yagi, K. 1986. Increased serum lipid peroxides initiate atherogenesis. *Bio Essays* 1 : 58 - 60.
- Yang, C.Y., Chan, L., and Gotto, A.M. 1987. The complete structure of human apolipoprotein B-100 and its messenger RNA. Dalam *Plasma Lipoproteins* (Gotto, A.M., Ed.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 77 - 93).